

人参皂苷 Rb1抑制 β 淀粉样蛋白₂₅₋₃₅诱导的皮层神经元 tau蛋白过度磷酸化

曾育琦, 陈晓春*, 朱元贵, 李永坤, 彭小松, 陈丽敏, 沈杰, 黄天文

(福建医科大学 附属协和医院 福建省老年医学研究所, 福建 福州 350001)

摘要: 目的 探讨人参皂苷 Rb1对凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅诱导的胎鼠皮层神经元 tau蛋白过度磷酸化的影响及其可能的作用机制。方法 通过蛋白免疫印迹法和免疫细胞化学染色法检测神经元 tau蛋白磷酸化水平、总 tau蛋白水平和糖原合成酶 3 β (GSK-3 β)的蛋白表达水平。结果 凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅(20 μ mol·L⁻¹)作用于皮层神经元 12 h, tau蛋白磷酸化水平和总 tau蛋白水平均增高,同时 GSK-3 β 蛋白表达也增多。用人参皂苷 Rb1或 GSK-3 β 特异性抑制剂氯化锂预处理后,凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅诱导的 tau蛋白的过度磷酸化受到明显抑制,同时 GSK-3 β 的表达也降低。结论 人参皂苷 Rb1可通过抑制 GSK-3 β 的表达来抑制凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅诱导的皮层神经元 tau蛋白的过度磷酸化。

关键词: 人参皂苷 Rb1; β 淀粉样蛋白₂₅₋₃₅; tau蛋白; 过度磷酸化; 糖原合成酶 3 β

中图分类号: R282.71; R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2005)03-0225-06

Ginsenoside Rb1 attenuates β -amyloid peptide₂₅₋₃₅-induced tau hyperphosphorylation in cortical neurons

ZENG Yu-qi, CHEN Xiao-chun*, ZHU Yuan-gui, LI Yong-kun, PENG Xiao-song, CHEN Li-min, SHEN Jie, HUANG Tian-wen

(Fujian Institute of Geriatrics, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

Abstract: **Aim** To explore the effect and the possible mechanism of ginsenoside Rb1 on β -amyloid peptide (β -AP)₂₅₋₃₅-induced tau protein hyperphosphorylation in cortical neurons. **Methods** Western blotting and immunocytochemical staining were used to detect tau phosphorylation level, total tau and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) in cortical neurons. **Results** After exposure to β -AP₂₅₋₃₅ (20 μ mol·L⁻¹) for 12 h, the levels of tau protein phosphorylation in the sites of Ser 396, Ser 199/202, Thr 231 and total tau were raised. Meanwhile, the expression of GSK-3 β also increased. Pretreatment with ginsenoside Rb1 or lithium chloride, a specific inhibitor of GSK-3 β , markedly reduced β -AP₂₅₋₃₅-induced tau hyperphosphorylation and the expression of GSK-3 β . **Conclusion** Ginsenoside Rb1 can attenuate β -AP₂₅₋₃₅-induced tau protein hyperphosphorylation in cortical neurons by inhibiting the expression of GSK-3 β .

Key words: ginsenoside Rb1; β -amyloid peptide₂₅₋₃₅; tau protein; hyperphosphorylation; glycogen synthase kinase-3 β

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)是常见的中枢神经系统退行性疾病,临床上以记忆力减退、认知障碍、人格改变为主要特征,其中 tau蛋白过度磷酸化是 AD的重要分子生化改变之一。过度磷酸

化的 tau蛋白首先聚集成双螺旋细丝 (paired helical filaments, PHFs),继而再形成神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)^[1]。NFTs的数量与 AD患者痴呆程度呈正相关^[2]。目前 AD仍缺乏有效的治疗药物,寻找理想的 AD治疗药物是当前神经病学的热点领域之一。

人参皂苷 Rb1是人参的主要活性成分之一。研究发现,人参皂苷 Rb1对多种实验动物模型的学

收稿日期: 2004-04-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271611).

* 通讯作者 Tel: 86-591-83377664, Fax: 86-591-83370393,

E-mail: chenxc998@sohu.com

习记忆障碍均有明显改善作用^[3],但其对 AD的分子生化改变,尤其是 tau蛋白的过度磷酸化是否有逆转作用,尚未有文献报道。本实验以 β -AP₂₅₋₃₅ 作用于胎鼠皮层神经元,建立 tau蛋白过度磷酸化的细胞模型,观察 Rb1 对 tau蛋白过度磷酸化是否有抑制作用,并探讨其可能的作用机制。

材料与方法

实验动物 Sprague-Dawley (SD)大鼠,孕期 (18 ± 2) d,由上海西普尔必凯实验动物有限公司提供。

药物及试剂 人参皂苷 Rb1 由吉林大学基础医学院有机化学教研室提供,纯度 >98%。 β -AP₂₅₋₃₅ 和氯化锂 (lithium chloride, LiCl) 购自 Sigma 公司。DMEM-F12 培养基、左旋多聚赖氨酸和 N₂ 添加剂均购自 Gibco 公司。胎牛血清购自杭州江滨生物技术有限公司。基础培养基: DMEM-F12, NaHCO₃ (2 g·L⁻¹), 青霉素 G (0.1 u·L⁻¹), 链霉素 (0.1 u·L⁻¹) 和 HEPES (1.19 g·L⁻¹)。完全培养基: 基础培养基 + N₂ 添加剂 + 10% 胎牛血清。无血清培养基: 基础培养基 + N₂ 添加剂 (DMEM-F12: N₂ = 1:1)。 β -Actin 单克隆抗体购自 NeoMarkers 公司, Tau-5 单克隆抗体购自 BD Pharmingen 公司, Tau [pS³⁹⁶], Tau [pSpS^{199/202}] 和 Tau [pT²³¹] 多克隆抗体购自 Biosource 公司, GSK-3 β 和磷酸化 GSK-3 β [pTyf^{279,216}] 多克隆抗体购自 Sigma 公司; Western Blotting 化学发光检测试剂盒购自美国 KPL 公司。

主要仪器 CO₂ 培养箱 (美国 Foma Scientific 公司); 低温离心机; 凝胶图像分析仪 (Alpha Emaer 2200, 美国安莱公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus CK40)。

凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅ 的制备 用超纯水将冻干的 β -AP₂₅₋₃₅ 溶解, 配成 1 mmol·L⁻¹ 储存液, 于 -20 °C 保存, 临用前于 37 °C 放置 4 h 使其凝聚。

皮层神经元原代培养^[4] 在无菌条件下取出胎鼠, 解剖分离大脑皮层, 分散细胞, 以细胞数约 2.5 × 10⁶ 孔接种于预先涂有左旋多聚赖氨酸的 6 孔板中, 加入完全培养基, 在 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养 3 d, 然后换上无血清培养基继续培养 3 d, 以抑制胶质细胞生长。d 7 时收集细胞用于各项实验。

药物干预及实验分组 (1) 对照组: 不加任何处理因素; (2) 模型组: 凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅ (20 μ mol·L⁻¹) 作用于皮层神经元 12 h; (3) LiCl 预处

理组: LiCl (10 mmol·L⁻¹) 和凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅ (20 μ mol·L⁻¹) 共同作用于皮层神经元 12 h; (4) 人参皂苷 Rb1 预处理组: 先加入不同浓度的人参皂苷 Rb1 (5, 10, 20, 40 μ mol·L⁻¹) 预处理 24 h, 再加入凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅ (20 μ mol·L⁻¹) 作用于皮层神经元 12 h。用于免疫细胞化学染色皮层神经元 Rb1 预处理的终浓度为 10 μ mol·L⁻¹。

tau蛋白磷酸化水平的检测

蛋白免疫印迹^[5] 将收集的细胞培养液吸弃, 用预冷的磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 2 次, 加入细胞裂解液, 冰面上裂解 20 min, 14 000 × g, 4 °C 离心 10 min, 吸取上清液, Bradford 法进行蛋白定量。以 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 半干电转移法转膜, 室温下用封闭液封闭 1 h 后加入用封闭液稀释的一抗 (Tau [pS³⁹⁶], Tau [pSpS^{199/202}], Tau [pT²³¹] 多克隆抗体和 Tau-5 单克隆抗体, 1:1 000 稀释), 4 °C 孵育过夜, 抗兔 IgG 二抗 (1:1 000 稀释) 反应 2 h, 化学发光法显色, X 射线底片曝光。 β -Actin 作为内参照。实验重复 3 次。

免疫细胞化学 培养的细胞用 3.7% 甲醛固定 30 min, 0.3% 过氧化氢甲醇溶液灭活内源性的过氧化物酶 10 min, 加入 Tau [pS³⁹⁶] (1:400 稀释), Tau [pSpS^{199/202}] (1:1 200 稀释), Tau [pT²³¹] (1:400 稀释) 多克隆抗体或 Tau-5 (1:800 稀释) 单克隆抗体 (用含 0.1% Triton X-100 的 0.01 mol·L⁻¹ PBS 稀释), 4 °C 孵育过夜后加入生物素标记的 IgG 二抗, 再加入链亲和素过氧化物酶溶液。最后用新鲜配制的 DAB 溶液显色, 中性树胶封片后于镜下观察拍照。

总 GSK-3 β 和活化型 GSK-3 β 检测

蛋白免疫印迹 方法同上。一抗为 GSK-3 β 和磷酸化 GSK-3 β (pTyf^{279,216}) 多克隆抗体 (1:1 000 稀释)。

免疫细胞化学 方法同上。一抗为 GSK-3 β (1:1 200 稀释) 和磷酸化 GSK-3 β (pTyf^{279,216}) (1:50 稀释) 多克隆抗体。

统计学处理 测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 软件包分析, 组间比较用单因素方差分析。

结果

1 人参皂苷 Rb1 对 β -AP₂₅₋₃₅ 诱导的皮层神经元 tau 蛋白磷酸化的影响

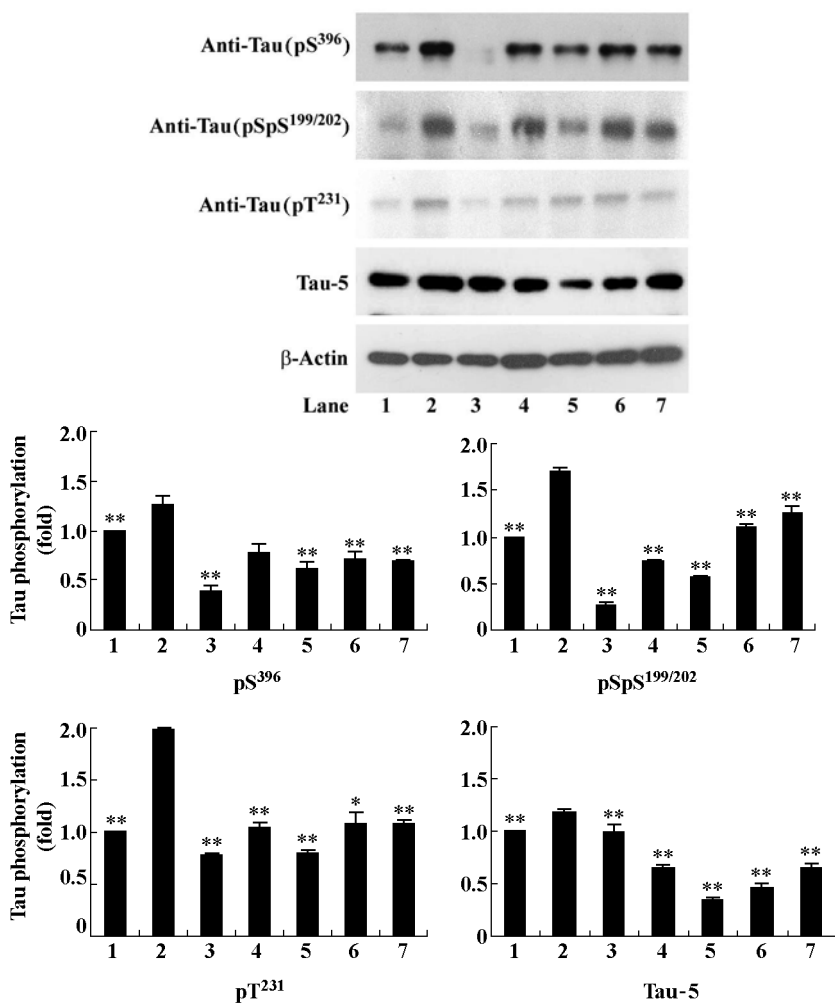
1.1 蛋白免疫印迹 从图 1 可见, 模型组 tau 蛋白

在 Ser396, Ser199/202, Thr231 位点的磷酸化水平明显较对照组增高。Tau-5 是磷酸化非依赖性抗体,反映细胞中 tau 蛋白的总量,其含量也增多,提示凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅ 在诱导皮层神经元 tau 蛋白磷酸化水平增加的同时,tau 蛋白表达水平也增加。LiCl 预处理组 tau 蛋白在上述位点的磷酸化水平和总 tau 蛋白水平均明显低于模型组;不同浓度的 Rb1 预处理后,总 tau 蛋白水平及 tau 蛋白在上述位点的磷酸化水平也较模型组减少,其中 Rb1 预处理浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,tau 蛋白磷酸化水平和总 tau 蛋白水平下降最为明显。由此可见,一定剂量的人参皂苷 Rb1 和 GSK-3 β 特异性抑制剂 LiCl 一样,具有抑制 β -AP 诱导的皮层神经元 tau 蛋白过度磷酸化的作用。

1.2 免疫细胞化学 从图 2 可见,模型组细胞内 tau 蛋白在 Ser396, Ser199/202, Thr231 位点磷酸化表达增高,总 tau 蛋白表达也增高,主要表现为胞浆和轴突的染色较对照组明显浓增, LiCl 预处理组和 Rb1 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理组 tau 蛋白在上述位点的磷酸化表达较模型组减少,总 tau 蛋白表达也减少,主要表现为胞浆和轴突的染色明显比模型组减弱。提示凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅ 可增加皮层神经元 tau 蛋白磷酸化,而 LiCl 和 Rb1 则能抑制此效应。

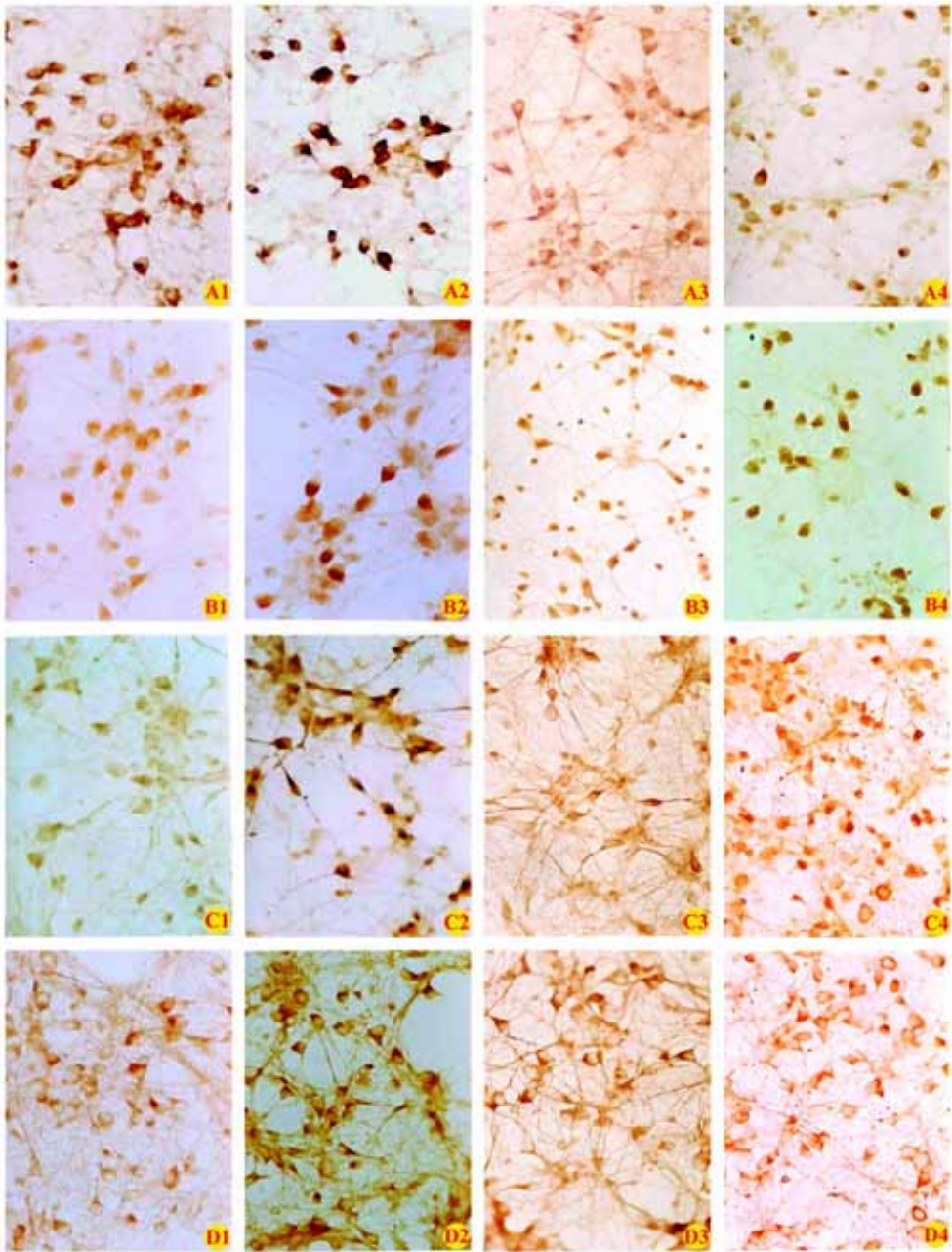
2 人参皂苷 Rb1 对皮层神经元 GSK-3 β 和磷酸化 GSK-3 β (pTyr^{279,216}) 表达的影响

2.1 蛋白免疫印迹 从图 3 可见,模型组 GSK-3 β 和磷酸化 GSK-3 β (pTyr^{279,216}) 的蛋白表达水平明显比对照组增高。可见凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅ 作用于皮层神



Lane 1: Control; Lane 2: β -AP₂₅₋₃₅; Lane 3: LiCl; Lane 4 - 7: Ginsenoside Rb1 (5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Figure 1 Ginsenoside Rb1 treatment reduced β -AP₂₅₋₃₅-induced site-specific modifications in tau phosphorylation. Then lysates were immunoblotted with a panel of phosphorylation-dependent antibodies (pS³⁹⁶, pSpS^{199/202}, pT²³¹) and non-phosphorylation-dependent antibody (Tau-5). Phosphorylation of Tau at each site was quantitated as densitometry values which were normalized with respect to the immunoreactivities to antibody β -actin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs β -AP₂₅₋₃₅



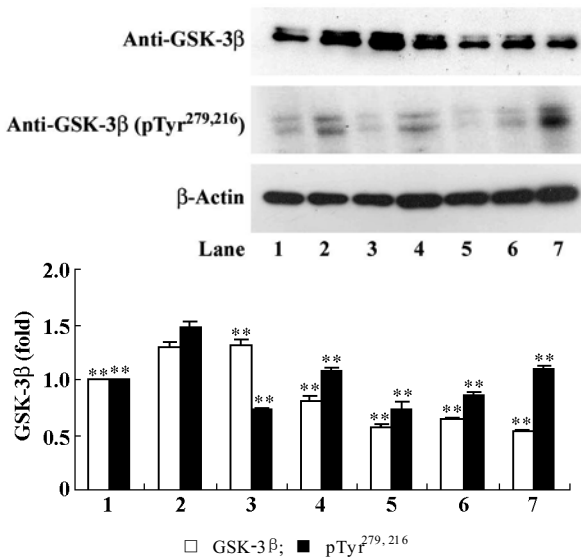
A1 - D1: Control; A2 - D2: β -AP₂₅₋₃₅; A3 - D3: Ginsenoside Rb1 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); A4 - D4: LiCl

Figure 2 Immunocytochemical staining for tau in cortical neurons. Brightfield micrographs show formaldehyde-fixed cells immunostained with a panel of phosphorylation-dependent antibodies (A: pS³⁹⁶; B: pSpS^{199/202}; C: pT²³¹) and non-phosphorylation-dependent antibody (D: Tau-5)

神经元 12 h 后,在诱导 tau 蛋白磷酸化的同时, GSK-3 β 和活化型 GSK-3 β 的表达也增多。LiCl 预处理组磷酸化 GSK-3 β (pTyf^{279,216})的蛋白表达水平明显低于模型组和对照组,而 GSK-3 β 的表达则稍高于模型组,说明 LiCl 在抑制 GSK-3 β 活性的同时能使 GSK-3 β 代偿性的表达增加。不同浓度 Rb1 预处理组 GSK-3 β 和磷酸化 GSK-3 β (pTyf^{279,216})的蛋白表达水平均低于模型组,其中以 Rb1 预处理浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, GSK-3 β 和磷酸化 GSK-3 β (pTyf^{279,216})

的蛋白表达减少最为明显,说明 Rb1 可抑制 GSK-3 β 活性。

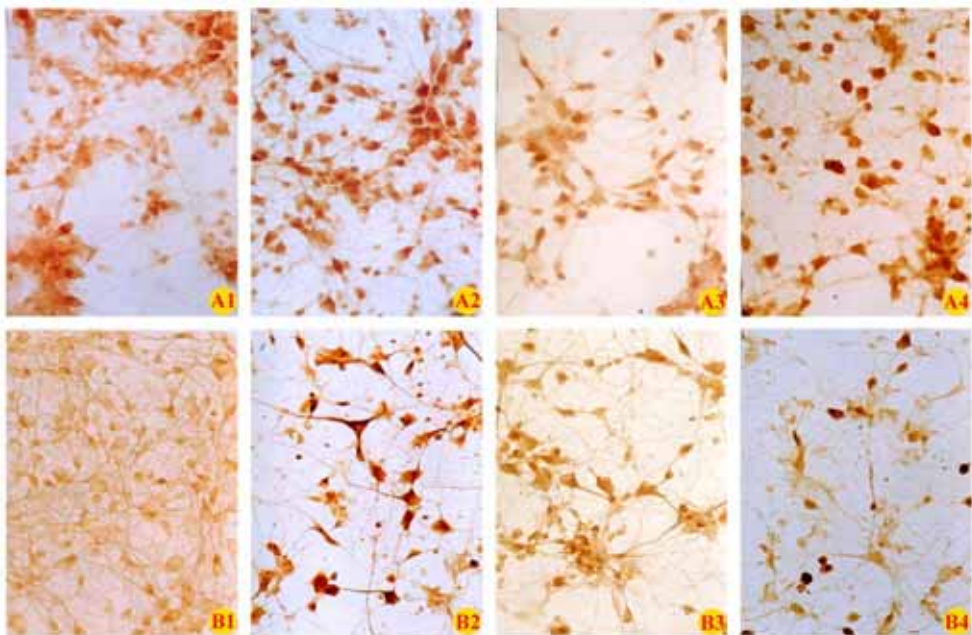
2.2 免疫细胞化学 从图 4 可见,模型组细胞内 GSK-3 β 和磷酸化 GSK-3 β (pTyf^{279,216})的表达均增高,主要表现为胞浆和轴突的染色明显比对照组增高。LiCl 预处理组磷酸化 GSK-3 β (pTyf^{279,216})的表达明显低于模型组,主要表现为胞浆和轴突的染色明显比模型组减弱;而 GSK-3 β 的表达则稍高于模型组。Rb1 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理后 GSK-3 β 和磷



Lane 1: Control; Lane 2: β -AP₂₅₋₃₅; Lane 3: LiCl; Lane 4 - 7: Ginsenoside Rb1 (5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Figure 3 Ginsenoside Rb1 reduced the levels of GSK-3 β and tyrosine phosphorylation of GSK-3 β (pTyr^{279,216}). Then lysates were immunoblotted with GSK-3 β and tyrosin phosphorylation of GSK-3 β (pTyr^{279,216}) antibodies. The expressions of GSK-3 β and tyrosine phosphorylation of GSK-3 β (pTyr^{279,216}) were quantitated as densitometry values which were normalized with respect to the immunoreactivities to antibody β -actin. * * $P < 0.01$ vs β -AP₂₅₋₃₅

酸化 GSK-3 β (pTyr^{279,216}) 的表达均减少,主要表现为胞浆和轴突的染色较模型组明显减弱。



A1 - B1: Control; A2 - B2: β -AP₂₅₋₃₅; A3 - B3: Ginsenoside Rb1 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); A4 - B4: LiCl

Figure 4 Immunocytochemical staining for GSK-3 β and tyrosine phosphorylation of GSK-3 β (pTyr^{279,216}) in cortical neurons. Brightfield micrographs show formaldehyde-fixed cells immunostained with GSK-3 β (A) and tyrosine phosphorylation of GSK-3 β (pTyr^{279,216}, B) antibodies

讨论

对 AD 仍缺乏有效的防治药物,目前临床主要用胆碱酯酶抑制剂治疗,但也只能改善早、中期患者的部分症状,不能减轻 AD 脑内分子生化的改变,阻止病情的进展。研究发现 Rb1 可增加乙酰胆碱的合成与释放^[6,7] 增加 M 胆碱受体数量^[8] 提高乙酰胆碱转移酶的活性^[9],从而达到改善实验动物模型的学习记忆障碍。但是,人参皂苷 Rb1 能否逆转 AD 的分子生化改变,特别是能否抑制 tau 蛋白的过度磷酸化,国内外均未见研究报道。

Tau 蛋白过度磷酸化是 AD 发病机制中的一个中心环节。体外研究表明,凝聚态的 β -AP₁₋₄₀ 或其活性片段 β -AP₂₅₋₃₅ 能使原代培养的海马神经元 tau 蛋白在特定定位点的磷酸化增多^[10-12]。本实验中,作者用 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅ 作用于大鼠皮层神经元 12 h,成功地诱导了 tau 蛋白在 Ser 396, Ser 199/202, Thr 231 位点的过度磷酸化,建立了具有 AD 样 tau 蛋白过度磷酸化的细胞模型。不同浓度的人参皂苷 Rb1 预处理该细胞模型后,tau 蛋白在上述位点的磷酸化水平降低,其中以 Rb1 预处理浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,tau 蛋白磷酸化水平降低最为明显。此外作者还发现该细胞模型总 tau 蛋白的表达有所增多,这可能与 tau 蛋白磷酸化后其降解减少有关^[13];而 Rb1 预处理后,总 tau 蛋白的含量也减少,其中也是以 Rb1 预处理浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

时,总 tau蛋白含量降低较为明显,这可能与 tau蛋白去磷酸化后有利于其降解有关。由此可见,人参皂苷 Rb1 可抑制 β -AP 诱导的 tau 蛋白过度磷酸化。

糖原合成酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)是引起 tau 蛋白磷酸化的关键性蛋白激酶。GSK-3 β 的活性受丝氨酸和酪氨酸磷酸化的调节。酪氨酸 Tyr^{279,216}位点磷酸化可使 GSK-3 β 的活性增加,而丝氨酸 Ser 9 位点的磷酸化则下调 GSK-3 β 的活性^[14,15]。作者的研究显示 β -AP₂₅₋₃₅在诱导 tau 蛋白过度磷酸化的同时,总 GSK-3 β 和活化型磷酸化 GSK-3 β (pTyr^{279,216})的表达也增高,而用 GSK-3 β 特异性抑制剂 LiCl 处理后,在抑制磷酸化 GSK-3 β (pTyr^{279,216})表达的同时,tau 蛋白磷酸化水平也显著下降。由此可见, β -AP 可能主要通过激活 GSK-3 β 引起 tau 蛋白的过度磷酸化。

本实验发现 Rb1 预处理浓度为 10 μ mol \cdot L⁻¹ 时,活化型 GSK-3 β 的表达下降最为明显,低于或高于此作用浓度的 Rb1 对活化型 GSK-3 β 表达的影响逐渐减弱。提示人参皂苷 Rb1 能通过抑制 GSK-3 β 的活性,从而达到抑制 β -AP 所诱导的皮层神经元 tau 蛋白的过度磷酸化,具有和 GSK-3 β 特异性抑制剂 LiCl 相似的功效。但二者又有所不同:LiCl 处理组总 GSK-3 β 的表达稍高于单纯 β -AP 作用组,这可能与 LiCl 抑制 GSK-3 β 而使细胞内的总 GSK-3 β 代偿性增多有关^[16]。而 Rb1 预处理后,总 GSK-3 β 并不增多,反而有所减少,这可能于 Rb1 在更高水平,如转录水平,抑制 GSK-3 β 的合成,这有待于进一步探讨。

本研究从分子生化上证实人参皂苷 Rb1 通过抑制 GSK-3 β 的活性而达到抑制凝聚态 β -AP₂₅₋₃₅所诱导的胎鼠皮层神经元 tau 蛋白过度磷酸化,对 AD 的防治具有潜在的应用前景。

References

[1] Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 1991, 6(4): 487 - 498.
 [2] Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, et al. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease [J]. *Neurology*, 1992, 42(3 Pt1): 631 - 639.
 [3] Chen SW, Wang LJ, Wang Y, et al. Effects of ginsenoside Rb1 and Rd on learning and memory function of mice [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2001, 15(5): 330 - 332.
 [4] Chen LM, Chen XC, Zhu YG, et al. β -Amyloid₁₋₄₀

induced apoptosis in rat cortical neurons [J]. *J Fujian Med Univ* (福建医科大学学报), 2001, 35(4): 311 - 314.
 [5] Lesort M, Jope RS, Johnson GV. Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3 beta and Fyn tyrosine kinase [J]. *J Neurochem*, 1999, 72(2): 576 - 584.
 [6] Benishin CG, Lee R, Wang LC, et al. Effects of ginsenoside Rb1 on central cholinergic metabolism [J]. *Pharmacol*, 1991, 42(4): 223 - 229.
 [7] Lee TF, Shiao YJ, Chen CF, et al. Effect of ginseng saponins on beta-amyloid-suppressed acetylcholine release from rat hippocampal slices [J]. *Planta Med*, 2001, 67(7): 634 - 663.
 [8] Zhang JT, Liu Y, Qu ZW, et al. Influence of ginsenoside Rb1 and Rg1 on some central neurotransmitter receptors and protein biosynthesis in mouse brain [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1988, 23(1): 12 - 16.
 [9] Salin KN, McEwen BS, Chao HM. Ginsenoside Rb1 regulates ChAT, NGF and trkA mRNA expression in the rat brain [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997, 47(1 - 2): 177 - 182.
 [10] Olivieri G, Baysang G, Meier F, et al. N-acetyl-L-cysteine protects SHSY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress and cell cytotoxicity: effects on beta-amyloid secretion and tau phosphorylation [J]. *J Neurochem*, 2001, 76(1): 224 - 233.
 [11] Rapoport M, Ferreira A. PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons [J]. *J Neurochem*, 2000, 74(1): 125 - 133.
 [12] Shea TB, Prabhakar S, Ekinci FJ. Beta-amyloid and ionophore A23187 evoke tau hyperphosphorylation by distinct intracellular pathways: differential involvement of the calpain/protein kinase C system [J]. *J Neurosci Res*, 1997, 49(6): 759 - 768.
 [13] Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, et al. Phosphorylation of microtubule-associated protein Tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5535 - 5544.
 [14] Bhat RV, Shanley J, Correll MP, et al. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta in cellular and animal models of neuronal degeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(20): 11074 - 11079.
 [15] Stambolic V, Woodgett JR. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation [J]. *J Biochem*, 1994, 303 (Pt 3): 701 - 704.
 [16] Takahashi M, Yasutake K, Tomizawa K. Lithium inhibits neurite growth and tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β -dependent phosphorylation of juvenile tau in cultured hippocampal neurons [J]. *J Neurochem*, 1999, 73(5): 2073 - 2083.